

校编码: 10384

分类号

密级

学号: 21620071151874

UDC

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

酵母双杂交技术筛选与 Hypo2
相互作用的蛋白

Identification of proteins interacting with Hypo2
by yeast two-hybrid technique

指导教师姓名: 林 圣 彩

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010 年 04 月 28 号

论文答辩时间: 2010 年 06 月 03 号

学位授予日期:

答辩委员会主席: 李 勤 喜

评 阅 人:

2010 年 04 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目 录	IV
TABLE OF CONTENTS	VII
摘 要	X
ABSTRACT	XI
第一章 前 言	1
1.1 功能构架蛋白 Axin 的研究进展	1
1.1.1 简介	1
1.1.2 Axin 基因的发现	1
1.1.3 Axin 的结构	3
1.1.4 Axin 在信号通路中的作用	6
1.2 Hypo2 背景	14
1.3 酵母双杂交系统及其应用	16
1.3.1 酵母双杂交系统基本原理	16
1.3.2 酵母双杂交系统的特点和应用	17
1.3.3 MATCHMAKER GAL4 TWO-Hybrid System3 简介	19
1.4 立题背景	22
第二章 材料和方法	23
2.1 常用的药品和试剂	23
2.2 DNA 相关实验方法	23
2.2.1 质粒载体	23
2.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备	25
2.2.3 DNA 转化	26
2.2.4 质粒 DNA 的提取	26
2.2.5 质粒 DNA 的工具酶处理	27
2.2.6 DNA 片段的纯化	28

2.2.7 DNA 连接反应·····	29
2.2.8 PCR 反应·····	29
2.2.9 诱饵蛋白表达质粒的构建·····	30
2.2.10 筛选到的阳性克隆表达质粒的构建·····	30
2.3 酵母双杂交相关实验方法·····	30
2.3.1 酵母菌株和培养基·····	30
2.3.2 诱饵基因表达蛋白样品制备·····	31
2.3.3 诱饵蛋白检测试验·····	31
2.3.4 两种酵母菌株杂交实验·····	32
2.3.5 酵母质粒的提取·····	34
2.3.6 酵母感受态细胞的制备及质粒 DNA 的转化·····	34
2.3.7 数据计算·····	35
2.4 细胞培养及转染·····	36
2.4.1 细胞培养·····	36
2.4.2 瞬时转染·····	36
2.5 蛋白质相关实验方法·····	37
2.5.1 免疫沉淀·····	37
2.5.2 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳与 Western blotting 分析·····	37
第三章 结果与分析·····	39
3.1 酵母双杂交部分·····	39
3.1.1 诱饵蛋白表达质粒的构建·····	39
3.1.2 诱饵蛋白表达·····	39
3.1.3 诱饵蛋白毒性检测·····	40
3.1.4 诱饵蛋白自激活检测·····	41
3.1.5 鼠脑 cDNA 文库的筛选·····	41
3.1.6 文库质粒酶切鉴定·····	41
3.1.7 酵母中重新检验蛋白相互作用·····	42
3.1.8 测序、序列比对·····	43
3.2 利用哺乳动物细胞验证蛋白间的相互作用·····	46

3.2.1 构建在哺乳动物细胞表达的 Hypo2 质粒·····	46
3.2.2 全长 Rasgrp1、Rnd2、Gnb5 质粒的构建·····	47
3.2.3 免疫共沉淀验证蛋白间相互作用 ·····	48
3.3 结果讨论 ·····	49
参 考 文 献·····	51
图 表 索 引·····	56
致 谢·····	57

TABLE OF CONTENTS

Table of content (In Chinese)	IV
Table of content (In English)	VII
Abstract (In Chinese)	X
Abstract (In English)	XI
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Review on Axin	1
1.1.1 Introduction	1
1.1.2 Finding of Axin	1
1.1.3 Structure of Axin	3
1.1.4 Roles of Axin in signaling pathways	6
1.2 Hypo2 background	14
1.3 Theory and application of Yeast Two-Hybrid	16
1.3.1 Introduction of Yeast Two-Hybrid	16
1.3.2 Application of Yeast Two-Hybrid	17
1.3.3 Principle of MATCHMAKER Gal4 Two-Hybrid System ³	19
1.4 Project background	22
Chapter 2 Materials and methods	23
2.1 Chemicals and reagents	23
2.2 Work on DNA	23
2.2.1 Vector	23
2.2.2 Preparation of E.coli competent cell	25
2.2.3 DNA transformation	26
2.2.4 DNA preparation	26
2.2.5 Enzymatic manipulation of plasmid DNA	27
2.2.6 Purification of DNA fragment	28
2.2.7 DNA ligation	29

2.2.8 Polymerase chain reaction	29
2.2.9 Constructing the bait plasmid	30
2.2.10 Constructing full-length of the prey plasmid	30
2.3 Yeast Two-Hybrid Work.....	30
2.3.1 Host strain and media	30
2.3.2 Verify the DNA-BD/bait protein expression	31
2.3.3 Testing the DNA-BD/bait protein	31
2.3.4 Yeast mating	32
2.3.5 Isolate plasmid DNA from yeast.....	34
2.3.6 Preparation of Yeast competent cell and DNA transformation.....	34
2.3.7 Data analysis	35
2.4 Cell culture and DNA transfection	36
2.4.1 Cell culture	36
2.4.2 Transient transfection.....	36
2.5 Protein work	37
2.5.1 Immunoprecipitation	37
2.5.2 Electrophoresis of protein in SDS-PAGE gel and Western blotting	37
Chapter 3 Results and Discussion.....	39
3.1 Yeast two-hybrid screen	39
3.1.1 Constructing the bait plasmid	39
3.1.2 Expression the DNA-BD/bait plasmid in AH109	39
3.1.3 Testing the DNA-BD/bait protein	40
3.1.4 Testing the DNA-BD/bait protein for toxicity effects	41
3.1.5 Screening mouse brain cDNA library	41
3.1.6 Rescue AD/library clones by Transformation of E. coli.....	41
3.1.7 Retest protein interactions in yeast	42
3.1.8 Sequence AD/library inserts	43
3.2 Verify proteins interaction in mammalian cells	46
3.2.1 Constructing Hypo2 plasmids expressed in mammalian cells	46

3.2.2 Constructing full-length of the R1、 R2 and G5 plasmids	47
3.2.3 Testing protein interactions with Co-Immunoprecipitation.....	48
3.3 Conclusion	49
References	51
Lists of figures and tables.....	56
Acknowledgement	57

摘 要

体轴抑制因子 Axin 作为一个多功能构架蛋白, 参与诸如 Wnt, JNK, TGF β , p53 等众多信号通路的调节, 在细胞凋亡、体轴发育、肿瘤发生等生理病理过程中发挥着重要作用。我们实验室发现了一个新基因, Axin 能与该基因编码的蛋白相互作用, 暂将其命名为 *Hypo2*。序列分析及同源性比对显示, *Hypo2* 是一个进化上很保守的蛋白, 其在人、小鼠、斑马鱼及果蝇中保持着很高的同源性, 这暗示它可能参与某些重要的生物学过程, 然而关于 *Hypo2* 的功能至今仍所知甚少。为了阐明 *Hypo2* 这一全新蛋白的功能以及 Axin 在其中的作用, 本论文利用酵母双杂交系统, 以 *Hypo2* 为诱饵蛋白, 从小鼠大脑 cDNA 文库中筛选和 *Hypo2* 相互作用的蛋白。结果共筛选出 467 个阳性克隆, 包含了 110 个基因。运用免疫共沉淀技术, 进一步确认了 *Hypo2* 和 Rnd2, Rasgrp1 及 Gnb5 的相互作用, 证实了酵母双杂交的结果真实可靠, 为后续对 *Hypo2* 及 Axin 的功能研究, 提供了重要的基础数据和研究方向。

关键词: *Hypo2*; 酵母双杂交; Axin

ABSTRACT

Axis inhibitor (Axin) is a scaffold protein with multiple functions. It takes part in the regulation of many signaling pathways, such as Wnt, JNK, TGF β and p53 pathways, and plays an essential role in various physiological and pathological processes, such as apoptosis, axis development and tumorigenesis. Our work (unpublished) demonstrated that Axin could interact with the protein product encoded by a novel gene *Hypo2* which is a novel gene by a yeast two-hybrid screen using Axin as a bait. Sequence analysis and homolog alignment showed that *Hypo2* is a conserved protein and contains homologue in *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Mus musculus* and *Homo sapiens*, implying that it may perform similar biological functions in different species. In order to identify novel hypo2 interacting protein and provide clues to the functions of *Hypo2* and the potential role of Axin in regulating it, here I have performed another round of yeast two-hybrid screening with a cDNA library from the mouse's brain using *Hypo2* as a bait. As a result, 467 positive clones that cover 110 genes were isolated. I then performed immunoprecipitation assays to confirm the interactions of *Hypo2* with Rnd2, Rasgrp1 and Gnb5 and found that *Hypo2* indeed interacts with these proteins in mammalian cells, indicating that our yeast two-hybrid screening results have high reliability. My work has thus provided a fundamental support to the research of the functions of *Hypo2* and Axin.

Key word: *Hypo2*; yeast two-hybrid; Axin

第一章 前言

1.1 功能构架蛋白 Axin 的研究进展

1.1.1 简介

Axin 基因为体轴发育抑制因子(Axis inhibitor)的简称。该基因最早作为小鼠的 *Fused* 基因被克隆^[1]。*Fused* 小鼠体轴发育异常,暗示了 *Axin* 在小鼠体轴发育过程中发挥着重要作用。随后对 *Axin* 的研究进一步证实了这一点,并从果蝇、斑马鱼、爪蟾、大鼠、人中相继发现了其同源基因,对序列的分析显示该基因保持了高度的保守性^[1-4]。*Axin* 是经典 Wnt 信号通路的重要成员蛋白,其参与 β -catenin 的调节,进而影响了 Wnt 信号通路下游基因的表达。随着对 *Axin* 基因研究的深入,研究人员发现 *Axin* 是一个多功能构架蛋白(scaffold protein),包含众多的结构域,通过这些结构域与多种蛋白相互作用,进而参与众多的信号通路的调节,如 Wnt, JNK, TGF- β , P53, mTOR 等信号通路^[5]。

1.1.2 *Axin* 基因的发现

Axin 基因突变的小鼠(*Axin*^{Fu})早在 1937 年就有报道^[6]。*Axin*^{Fu} 为显性突变,有明显的体轴尾部卷曲或变短,也会出现耳聋,华尔兹舞动症及泌尿系统缺陷。除了 *Fused* 之外, *Axin* 还有其它三种等位基因 *Fu*^{Ki}, *Fu*^{Kb}, *Fu*^{Tgl}^[1, 7-9]。*Fu*^{Ki} 小鼠于 1940 年被发现,为半显性等位基因,其纯合突变株胚胎致死,而杂合体大多表现为体轴及骨骼发育不良^[10]。*Fu*^{Kb} 于 1984 年被发现,其纯合突变株也是胚胎致死,杂合体也有明显的体轴发育缺陷^[8]。*Fu*^{Tgl} 则为缺陷性突变,其杂合体没有明显的表型,而纯合体表现为尾部卷曲。不难发现,这些小鼠都有一个共同的缺陷:体轴发育缺陷。这些都暗示了 *Axin* 在体轴发育中发挥着重要作用。F.constantini 小组利用对转座子插入序列的分析最早克隆了 *Axin* 基因^[1]。

在 *Axin* 基因被克隆后不久, *Axin2* 基因(也称 *conductin*)在 *Axin* 的酵母双杂交实验中被筛选出来。其蛋白产物与 *Axin* 有高度的同源性。随后, *Axin* 的同源基因在线虫、果蝇、斑马鱼、爪蟾、大鼠和人中陆续被发现^[1-4],并且也证明了其体轴抑制功能在不同物种间的一致性。*Axin* 的蛋白序列在进化中高度保守,如图 1-1 序列比对所示:

HUMAN	1	-----MNIQEQGFPLDLGASFTEDAPRPPVPGEELVSTDPRPASYSFCSGKGVGKICE
MOUSE	1	MQSPKMNVEQEGFPLDLGASFTEDAPRPPVPGEELVSTDSPRVNHSFCSGKGTSTKSE
ZEBRAFISH	1	-MSMSVNEKGICMLFDLGSSFTEDAPRPPVPGEEDLVSSDGRQYNHSFYSSKSDSLKNE
FLY	1	-----MSGHPSGIRKHDDNECSGPRPPVPGEESRVKKMTEG-----
HUMAN	56	TSTATPRRSDLDLGYEPEGSASPTPPYLKWAESLHSLDDQDGISLFRFTLKQEG--CAD
MOUSE	61	TSTATPRRSDLDLGYEPEGSASPTPPYLKWAESLHSLDDQDGISLFRFTLKQEG--CAD
ZEBRAFISH	60	ASITATPRRPDLDLGYEPEGSASPTPPYLKWAESLHSLDDQDGIHLFRFTLKQEE--CAD
FLY	37	-----VADTSKNSSESYLNWARTLNHLLDRDGVLEFKKYVEEEAPAYND
HUMAN	114	LLDFWFACSGFRKLEPCDSNEEKRLKLARAIYRKYILDNNGIVSRQTKPATKSFIKGCTM
MOUSE	119	LLDFWFACSGFRKLEPCDSNEEKRLKLARAIYRKYILDNNGIVSRQTKPATKSFIKDCVM
ZEBRAFISH	118	MLDFWFACSGFRKQEAANDGNE-KMLKLAKAIYKKYILDNNGIVSRQIKPATKSFIKDCVT
FLY	82	HNIFYFACEGLKQQTDPKIKQIIGATYRFLRKSQLSISDDIRAQIKAKITN-----P
HUMAN	174	KQLIDPAMFDQAQTEIQATMEENTYPSFLKSDIYLEYTRTGSESPKVCSDQSSSGSGTGKG
MOUSE	179	KQQLIDPAMFDQAQTEIQSTMEENTYPSFLKSDIYLEYTRTGSESPKVCSDQSSSGSGTGKG
ZEBRAFISH	177	KLHIDPAMFDQAQTEIQATMEENTYPLFLKSDIYLEYTRTGSESPKLFSDQSSVSGNGKV
FLY	135	EIPSEHIFDPMQRHVEVTIRDNIYPTFLCSEMYITLYIQQMSAQQERCTSSG---ATGSG
HUMAN	234	ISGYLPTLNEDEEWKCDQDMDEDDGRDAAPPGRLPQKLLLETAAPRVSSRRYSEGREFR
MOUSE	239	MSGYLPTLNEDEEWKCDQDADEDDGRDPLPSSRLTQKLLLETAAPRAPSSRRYNEGREL
ZEBRAFISH	237	LPGYLPTVIEDVEWRCDQEEQIAESDPTSPNRLTQKLPLETVPQVANSRYQDNREYR
FLY	192	SAGSSGSGGSSLAGACALPPTASGKQQLP-----QLVPPGAFINLPVSSVSGPP
HUMAN	294	YGSWREPVNPYYVNGYALAPATSANDSEQQLSSDADTLSLTDSSVDGIPPYRIRKQHR
MOUSE	299	YGSWREPVNPYYVNSGYALAPATSANDSEQQLSSDADTLSLTDSSVDGIPPYRIRKQHR
ZEBRAFISH	297	HASWREPVNPYYVNSGYALAPATSANDSEQQSMSSDADTLSLTDSSVDGVPPYRYRKPHR
FLY	242	AGTCSASGSVYGPSISASSSGSISATDILPRSSLPTLHEDSVLSLCDDFEKVQMQEGGG
HUMAN	354	REMQUESVQVNGRVPLPHIPRTYRVPKEVRVEPQKFAEELIHRLEAVQRTREAEKLEERL
MOUSE	359	REMQUESTQVNGRVPLPHIPRTYRMPKEIRVEPQKFAEELIHRLEAVQRTREAEKLEERL
ZEBRAFISH	357	REIHESAKVNGRVPLPHIPRTNRIPKDIEVEPEKFAELISRLEGVLREAEQEKLEERL
FLY	302	SLGSGSVGAGARAPDYPIRLTRDLIATQKRRLEIRPPGAHGYYVNPSTNTSYVPNSRV
HUMAN	414	KRVRMEEEGEDGDPSSGPPGPGCHKLPAPAWHHFPPRCVDMGCA--GLRDAHEENPESIL
MOUSE	419	KRVRMEEEGEDGEMPSGP-MASHKLPSVPAWHFPPRYVDMGCS--GLRDAHEENPESIL
ZEBRAFISH	417	KRVRLEEEGDADISTGPSLANHRVPPAVHVQHYGGRYSEMYSYNGLOLRDAHEENPESIL
FLY	362	DSEASVSSGGRTDSDTMSISSCSMDGRPIYIQRHSSSTESKAIR-QSAMANKETNTFQVI
HUMAN	472	DEHVQRVLRTPGRQSPGPG-----HRSPDSGHVAKMPVALGGAASGHGKHVPKSGAKLDA
MOUSE	476	DEHVQVRMRTPGCQSPGPG-----HRSPDSGHVAKTAVLGG--TASGHGKHVPKLGKLDT
ZEBRAFISH	477	DEHVQVRVMTPGCQSPGTGRHSPKRSRSPDGLPACKIPGLMMPLSGGQGHQARQGPKEA
FLY	421	PRTQRLHSNEHRPLKEEELVSLIPKLEEVKRKRDEERARERNPGALLTNERSSASDR

HUMAN	527	AGLHHHRHVHHVHHS	STARPKEQVEAEATRR	QSSFAWGLEPHSHGARS	RGYSES	VGAP
MOUSE	530	AGLHHHRHVHHVHNS	SARPKEQMEAEVARR	VQSSFSWGPETHGHAK	PRSYSENAG	--TT
ZEBRAFISH	537	AHLHHKHIHH	THYAAAGKPKQEAEAA	AR-MHGGFAWNT	EQHHYGP	KSRNYADGMSVGP
FLY	481	AFAEAIR	REKFALEDEN	DQDILDQHVSRVWK	DQTPHRSP	GTMSPCPPIPSRRRTATHDSGM
HUMAN	587	NASDGLAHSGKVG	VACKRNAKKAESGKS	SASTEVP	GASEDAEKNQKIMQW	IIEGEKEISRH
MOUSE	588	LSAGDLAFGGKTS	SAPSKRNTKKAESGKN	ANAEVPS	TEDAEKNQKIMQW	IIEGEKEISRH
ZEBRAFISH	596	NTMDPMGYSSK	GSTLSKRPVRKGED	GENFEMREPL	PADDME	RNQKILQWMMEGEKEAGRY
FLY	541	VSDGAMSLSGH	SMKHSKSM	PDHSSCSRKL	TNKWPSMNT	DSGISMFADTVTKYKDASSRS
HUMAN	647	RRTGHGSS	-GTRKPQPHENS	RPLSLEHP	-----	WAGPQLRTSVQPSHLFIQDPTMPPEPA
MOUSE	648	RKAGHGSS	-GLRKQQAHESS	RPLSIERPGAVHP	WVSAQLRNSVQPSHLFIQDPTMPPNPA	
ZEBRAFISH	656	KRGPGSISGPK	KAQGHEPARPSS	VERLGAVHP	WVTAQLRNNVQPSH	PFQDPTMPPNPA
FLY	601	GSSTASKLEEAK	RRLDEPRRS	RRYAQPPMQHLS	QQPLASFSSSS	SGGSISLPHQPPPLP
HUMAN	701	PNPLTQLEEARRR	LEEEKRA	SPSKQRYVQ	EVMRGRACVR	PACAPVLHVVPVAVSDME
MOUSE	707	PNPLTQLEEARRR	LEEEKRA	NKLPSKQ	-----	-----
ZEBRAFISH	716	PNPLTQLEEARRR	LEEEERRK	SGTLQAKQ	-----	-----
FLY	661	AKPP	-----	-----	-----	-----
HUMAN	761	LSETETR	SQRKVGGGSAQPCDS	SIVVAYYFCGEPI	PYPRTLVRGRAVTLGQF	KELLTKKGSY
MOUSE	735	----R	TKSQRKAGGSAEPCDS	SIVVAYYFCGEPI	PYPRTLVRGRAVTLGQF	KELLTKKGSY
ZEBRAFISH	745	-----	HKNMKKQPCENIT	VAYYERGEREPI	PYPRTSVKGRIT	VTGQF
FLY	665	-----	ETVVVFSC	EEPVPYRIKIPGTQPTLR	QFKDYLP	PRRGHF
HUMAN	821	RYYFKKVSDEF	DCGVVFEEVREDEAV	LPVFEEKIIGK	VEKVD	
MOUSE	791	RYYFKKVSDEF	DCGVVFEEVREDEAV	LPVFEEKIIGK	VEKVD	
ZEBRAFISH	794	RYYFKKVS	YEFDCGVVFEEVREDDAIL	PIFEEKIIGK	VEKVD	
FLY	704	REFFKTHCED	PDSPVITQEEIVN	SDILPLFGDKAMGL	VKPSD	

图 1-1. Axin 序列在人、小鼠、斑马鱼、果蝇中的同源性比较

Fig.1-1. The alignment of Axin protein in human, mouse, zebrafish and fly

1.1.3 Axin 的结构

Axin 包括 *Axin1* 和 *Axin2* 两个基因。由于 *Axin2* 的外源表达无法逆转 *Axin1* 突变引起的小鼠胚胎致死，表明 *Axin1* 和 *Axin2* 在功能上并不完全等同。此外，*Axin1* 为全身性表达，而 *Axin2* 的表达具有组织特异性。*Axin2* 表达同时受到 Wnt 信号的调节：Wnt 信号激活，*Axin2* 表达量上升，而 *Axin2* 表达量的上升又会抑制 Wnt 信号，从而达到对 Wnt 信号通路的负反馈调节^[1]。尽管如此，*Axin1*

和 Axin2 在蛋白序列上高度同源，且功能上存在一定程度的冗余^[12]。相对 Axin2 而言，Axin1 在许多物种中受到更为广泛的研究，其中以小鼠的研究最为透彻。故以下本论文对 Axin 的讨论如无特别说明，Axin 即代表小鼠 Axin1。Axin 的结构功能域如图 1-2 所示。



图 1-2. Axin 功能域示意图

Fig.1-2. The schematic diagram of the domains of Axin

(引自卢再恋. Fused 小鼠自然突变体 Axin^{Fu-NT}影响野生型 Axin 功能的分子机理^[13].)

(1) RGS domain

Axin N 端的第 89-216 个氨基酸序列与 G 蛋白信号家族(regulator of G protein family, RGS family)调节因子有高度的同源性，称为 RGS domain。Kishida 等在酵母双杂交系统中发现了 Axin 可以与肿瘤抑制因子肠腺息肉瘤蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)相互作用。APC 含有三个保守的重复序列：S-A-M-P, APC 就是通过该序列与 Axin 的 RGS domain 发生相互作用^[14]。尽管如此，在对 Axin-APC 复合物晶体结构的研究中发现，Axin 的 RGS domain 与 APC 结合的作用面和其它的含 RGS domain 的蛋白与 G 蛋白的作用面并不相同^[15]。对一维序列的分析也发现，Axin 与 APC 相互作用的关键氨基酸在 G 蛋白信号家族中并不保守，这也解释了 APC 特异的与 Axin 结合，而不与其它已知的含 RGS domain 蛋白相互作用。

(2) GSK-3β

Axin 第 353-437 个氨基酸序列能与糖原合成激酶 3-β亚型(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)相互作用^[2]，该区域称为 GSK-3β结合区域(GSK-3β binding site)。Dajani R 等用 Axin 的 GSK-3β结合区域的片段与 GSK-3β共结晶的方法，得到了其相互作用的三维分子结构^[16]。发现 Axin 与 GSK-3β结合表面的核心区

域由一个 α 螺旋(aa 262-273)和一个环(aa 285-298)组成。而这一区域同 FRAT 与 GSK-3 β 的相互作用区域相同,这暗示着 Axin 可能与 FRAT 竞争结合 GSK-3 β 。果然, Dajani R 等紧接着证实了这一推测。此外, Axin 第 330 位丝氨酸、第 341 位酪氨酸、第 343 位丝氨酸均可被 GSK-3 β 磷酸化,这些位点的磷酸化可以增加 Axin 蛋白的稳定性^[17]。

(3) β -catenin

β -catenin 是经典 Wnt 信号通路的核心, Wnt 信号通路主要通过调节 β -catenin 蛋白的稳定性和核质分布来调节其转录活性,进而调节下游效应基因的表达。Axin 第 437-506 个氨基酸序列为 β -catenin 结合区域。 β -catenin 包含 10 个重复的结构域,通过第 2-7 个该结构域与 Axin 相互作用,称为 Armadillo 结构域。对 Axin 的 β -catenin 结合区域蛋白片段与 β -catenin 进行共结晶,得到的晶体结构分析表明: Axin 的该片段形成一个 α 螺旋凸起,与 armadillo 的凹槽相契合。Axin 与 β -catenin 的结合域(aa 437-506)位于 Axin 与 GSK-3 β 结合域(aa 353-437)的旁边,三者可形成一个三聚体复合物^[18]。该复合物的形成有助于 GSK-3 β 和 CKI 对 β -catenin 的磷酸化,进而促进泛素化介导的 β -catenin 蛋白的降解。

(4) PP2A

蛋白的磷酸化修饰是机体中一种重要的翻译后修饰机制,在信号传导中发挥着重要作用,也是近几年备受关注的研究热点。protein phosphatase 2A(PP2A)作为体内四种主要的蛋白磷酸酶之一,由于其功能涉及很大一部分信号通路的调节,尤为受到关注。PP2A 是由三个亚基组成的蛋白复合体, A 亚基为构架亚基(scaffold subunit), B 亚基为调节亚基(regulatory subunit), C 亚基为催化亚基(catalytic subunit),即活性亚基。在这三个亚基中, A、C 亚基从酵母到人的各个物种中都极为保守,尤其是其 C 端,在果蝇和人之间只有几个氨基酸的不同, A 和 C 亚基一般各由一到两个极为相似的基因编码,一般认为是同一个基因扩增所致。而 B 亚基则不同,其包含 B, B', B''及一些病毒蛋白,共四类。而各类 B 亚基又由众多的基因编码,同一类 B 亚基的成员序列类似,而不同 B 亚基序列差异极大。B 亚基作为调节亚基,由于其种类众多,为 PP2A 在体内行使不同的功能提供了结构基础。

Axin 的 aa 508-712 之间的蛋白片断可以和 PP2A 的 C 亚基相互作用^[19]。而

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库